AENOR laboratorio
Alimentación

VALIDACIÓN UNE-EN ISO 16140

MÉTODO QFAST®

DETERMINACIÓN DE SALMONELLA
MÉTODO CUALITATIVO

Edición 3 *(14-07-2016)*

AENOR

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN 3

2.- MÉTODO ALTERNATIVO Y MÉTODO DE REFERENCIA 4

2.1.- PRINCIPIO Y PROTOCOLO DEL MÉTODO ALTERNATIVO 4

2.2.- MÉTODO DE REFERENCIA 9

3.- ESTUDIO DE COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS 9

3.1.- EFICACIA RELATIVA, ESPECIFICIDAD RELATIVA Y SENSIBILIDAD RELATIVA 9

3.2.- LIMITE DE DETECCION RELATIVA *(*LDR*)* 26

3.3.- INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD 28

4.- ESTUDIO COLABORATIVO 2014 29

4.1.- ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO 29

4.2.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS 31

4.3.- CÁLCULOS 32

4.4-INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO COLABORATIVO 38

5.- INTERPRETACIÓN 41

6.- AUDITORÍAS 50

7. APLICABILIDAD 51

8.- CONCLUSIÓN 53

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo del método alternativo EASY QFast® 54

Anexo 2 – Método de referencia ISO 6579:2002-Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de Salmonella spp 55

Anexo 3 – Método de referencia ISO 6579/A1- Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de Salmonella spp. Modificación 1: Anexo D. Detección de Salmonella spp en heces de animalr y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria. 56

1.- INTRODUCCIÓN

Todos los datos expuestos en el presente informe forman parte del informe inicial, emitido el 17-03-14, los obtenidos en la "Ampliación" realizada durante los años 2014-2015 y los obtenidos en la ampliación de la categoría Carnes.

Los resultados obtenidos que figuran en las tablas correspondientes así como el tratamiento de ellos se han realizado según la norma UNE-EN ISO 16140.

Fabricante: iMICROQ, Integrated Microsystems for Quality of Life, S.L.
Polígon Industrial Riu Clar
C/ Ferro 6 (nau 7)
43006 Tarragona, Spain

Laboratorio experto: AENORlaboratorio
Miguel Yuste, 12, 4ª planta.
28037 Madrid

Método a validar: método QFast®, método rápido para la detección de *Salmonella* spp.
Referencia de validación Norma UNE-EN ISO 16140: 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos.
UNE-EN ISO 16140:2003/A1:2012

Método de referencia: Norma UNE-EN ISO 6579: 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
Norma UNE-EN ISO 6579 (2003). Erratum: 2007 V2. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
Norma UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria.
Alcance de la validación:
Muestras veterinarias procedentes de la industria avícola.
Muestras de alimentación animal.
Muestras ambientales procedentes de producción primaria (industria avícola).
Alimentos en general: frutas y verduras, productos lácteos y productos varios, incluyendo especias, mayonesa y huevos; y carnes.

Organismo de certificación: AENOR

2.- MÉTODO ALTERNATIVO Y MÉTODO DE REFERENCIA

2.1.- PRINCIPIO Y PROTOCOLO DEL MÉTODO ALTERNATIVO

PRINCIPIO

a) Pre-enriquecimiento en medio 1

Añadir a 225 ml de medio de pre enriquecimiento la cantidad de muestra adecuada e incubación a 37ºC ± 1ºC durante 16 ±1 hora.

b) Enriquecimiento en medio 2:

Tomar 10 µl de la muestra pre enriquecida e incubar a 41,5 ºC ± 1ºC durante 7 horas ± 1 hora.

c) Inmunocaptura

Adicionar 1 gota de solución inmunocaptura e incubar, con agitación, a 37 ºC ± 1 ºC durante 30 minutos. Introducir el eppendorf en el separador magnético durante 3 minutos; retirar el sobrenadante, adicionar a continuación la solución de lavado y volver a introducir el eppendorf en el separador magnético durante 3 minutos. Retirar el sobrenadante.

d) Lectura

Añadir al tubo eppendorf 1 gota de solución reacción; agitar en vortex e incubar a 37 ºC ± 1ºC durante 30 minutos. Introducir 10 µl en el sensor del lector electromagnético.

PROTOCOLO

a) Pre enriquecimiento

1- Preparación de las muestras, en cabina de flujo laminar o, en su defecto, mechero Bunsen.

Muestras veterinarias (heces, cuellos, calzas)

- Heces:

  Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Hard. Si el medio Hard no contiene suplemento añadirlo.

- Cuello:

  Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Hard. Si el medio Hard no contiene suplemento añadirlo.

- Calzas:

  Se sumergen las 4 calzas en la duquesa que contiene el medio 1 Hard. Si el medio Hard no contiene suplemento añadirlo.

Muestras de alimentación animal

Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Soft. Si el medio Soft no contiene suplemento añadirlo.

Muestras ambientales (soportes, fondos de cajas)

- Soportes:

  Se sumerge el soporte en la duquesa que contiene el medio 1 Hard. Si el medio Hard no contiene suplemento añadirlo.

- Fondos de caja:

  Se recortan para obtener 25 g de muestra, con ayuda de material estéril, y se sumergen en la duquesa que contiene el medio 1 Hard. Si el medio Hard no contiene suplemento añadirlo.

Muestras alimentos

- Todas la matrices excepto carnes:

  Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Soft. Si el medio Soft no contiene suplemento añadirlo.

  En el caso de alimentos que contienen sustancias inhibidoras, como las especias, la preparación de las muestras se realizará siguiendo las indicaciones de la norma UNE-EN ISO 6887-4: 2003 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos distintos a la leche y producto lácteos, carne y producto cárnicos y, pescados y productos de la pesca".

- Carnes:

  Pesar, con precisión de ± 1%, 25 g de muestra en la duquesa que contiene el medio 1 Hard. Si el medio Hard no contiene suplemento añadirlo.

2- Una vez preparadas las muestras según se ha indicado en el punto 1, se procede de igual manera para todas ellas.

   Agitar manualmente la duquesa que contiene la muestra y el medio de pre enriquecimiento, en horizontal.

   Incubar la muestra a 37ºC ± 1 ºC durante 16 horas ± 1 hora.

b) Enriquecimiento en medio 2

Esperar a que el medio de enriquecimiento alcance la temperatura ambiente (entre 18 y 25ºC) antes de utilizarlo.

Se saca la muestra del incubador y se agita la duquesa horizontalmente de forma manual.

A continuación, se toman 10 µl, con pipeta fija, y se llevan al medio 2. Si tras agitar la duquesa de forma manual la muestra presentara espuma o partículas en suspensión que dificulten tomar los 10 µl, se procederá previamente a tomar 1 ml de la duquesa y pasarlo a un tubo eppendorf estéril; posteriormente, se agita en vortex y de ahí se toman los 10 µl, con micropipeta fija, y se llevan al medio 2. Agitar en vortex. Incubar a 41,5 ºC ± 1ºC durante 7 horas ± 1 hora, en incubador con agitación iMICROQ. En el caso de las muestras de heces el tiempo de incubación debe ser de 8 horas.

c) Inmunocaptura

Esperar a que la solución de inmunocaptura alcance la temperatura ambiente (entre 18 y 25ºC) antes de utilizarlos.

Al cabo de dicho tiempo, se saca el tubo eppendorf y se adiciona una gota de la solución inmunocaptura. Se procede a agitar en vortex y, posteriormente, se incuba a 37 ºC ± 1ºC durante 30 minutos.

Transcurrido el tiempo especificado se sacan los tubos eppendorf y se introducen en el separador magnético. Se agita manualmente unas cinco veces (movimientos suaves oscilatorios de 120º) sujetando con las manos las muestras para que no se desprendan del separador. Dejar reposar durante 3 minutos, controlados con cronómetro.

Retirar el sobrenadante del tubo eppendorf con una micropipeta pasteur, sin retirar el tubo del separador magnético. Manteniendo el tubo en el soporte (pero eliminando el imán), se adiciona 1 ml de la solución de lavado. Agitar manualmente aproximadamente 5 veces. Posteriormente, se sitúa el imán, y se deja reposar durante 3 minutos, controlado el tiempo mediante el uso de un cronómetro.

Manteniendo el tubo eppendorf en el separador, retirar exhaustivamente el sobrenadante con una pipeta Pasteur, y en el caso de quedar una pequeña porción en el fondo proceder a su retirada ayudada de la micropipeta de 100 µL.

d) Reacción para su lectura

Espere a que la solución de reacción alcance la temperatura ambiente (entre 18ºC y 25ºC) antes de utilizarlos.

Adicionar al tubo eppendorf una gota de la disolución de reacción, agitar en vortex e incubar a 37ºC ± 1 ºC durante 30 minutos en el incubador con agitación iMICROQ.

Se saca el eppendorf del incubador con agitación y se toman 10 µl con micropipeta fija y se depositan en el sensor, previamente atemperado, que anteriormente se ha fijado en el lector electrónico. Se procede a la lectura presionando la tecla start.

En el caso de que el resultado indicado por el lector sea Positivo, se procede a tomar, con asa de siembra, del mismo tubo eppendorf y se siembra en placa con un medio selectivo (por ejemplo agar XLD).

En la ampliación del estudio se ha sembrado en dos medios selectivos: XLD y ASAP.

e) Expresión de los resultados

Se considerará PRESENCIA de *Salmonella* spp. en la porción para análisis (especificando la masa en gramos, de la muestra analizada o superficie muestreada), cuando:

El sensor electroquímico indique: Positivo

Nota: si el sensor indica "retest" se procederá a realizar la medida de nuevo con otro sensor con la muestra sobrante del eppendorf, considerándose la segunda lectura como definitiva.

Un resultado con un valor del test Positivo indica que la muestra está contaminada presuntivamente con *Salmonella*.

En este caso se deberá proceder a la confirmación del resultado.

Se considerará AUSENCIA de *Salmonella* spp. en la porción para análisis (especificando la masa en gramos, de la muestra analizada o superficie muestreada), cuando:

El lector electroquímico indique: Negativo

Un resultado con un valor del test Negativo indica que la muestra no contiene *Salmonella* a una concentración inferior al límite de detección.

f) Confirmación de resultados positivos

Todos los resultados positivos del método QFast® *Salmonella* deben ser confirmados.

La confirmación debe realizarse empleando el líquido de reacción previo a la lectura y debe iniciarse a continuación de la lectura. Aislar en placas específicas, como por ejemplo XLD y ASAP. Incube las placas a 37ºC durante 24 horas. Confirme las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas y/o serológicas adecuadas.

A continuación se presenta un resumen de la descripción del método junto con el campo de aplicación y el método de referencia correspondiente.

Descripción	Campo de aplicación	Método de referencia
Método alternativo QFast® *Salmonella* HARD para la detección rápida de *Salmonella* spp	Muestras veterinarias procedentes de la industria avícola Muestras ambientales procedentes de producción primaria (avícola) Carnes	Norma UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007 Norma UNE-EN ISO 6579:2003
Método alternativo QFast® *Salmonella* SOFT para la detección rápida de *Salmonella* spp	Muestras de alimentación animal Muestras de alimentos excepto carnes	Norma UNE-EN ISO 6579:2003

Conservación de los medios de enriquecimiento y de los reactivos del método QFast®

Medio 1: medio de pre enriquecimiento (HARD):

- Presentación en duquesas con 225 ml del medio con sumplemento. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación en duquesas con 225 ml del medio sin sumplemento. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación en bote de medio de preenriqueceimiento deshidratado sin suplemento. Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad 3 años desde su fabricación.
- Suplemtento medio 1 en envase de vidrio con gotero. Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad 15 meses desde su fabricación.

Medio 1: medio de pre enriquecimiento (SOFT):

- Presentación en duquesas con 225 ml del medio con sumplemento. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación en bote de medio de preenriqueceimiento deshidratado sin suplemento. Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad 3 años desde su fabricación.
- Suplemtento medio 1 en envase de vidrio con gotero (solo para la presentación en deshidratado). Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad 1 año desde su fabricación.

Medio 2: medio de enriquecimiento

- Presentación en tubos eppendorf con 1 ml del medio. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde su fabricación.
- Presentación deshidratado en bolsas de aluminio 2,8 g. Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad tres años desde su fabricación.

Solución inmunocaptura: presentación en bote de 3 ml con gotero. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad dos años desde su fabricación.

Solución de lavado: presentación en bote de aproximadamente 50 ml con gotero. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad un año desde su fabricación.
Solución de reacción:

- Presentación en bote de 5 ml con gotero. Conservación entre -21 y -5ºC. Caducidad un año desde su fabricación.
- Presentación de dos botes de 3 ml con gotero; uno con la solución de reacción deshidratada y otro con la solución diluyente. Conservación entre -21 y -5ºC. Caducidad un año desde su fabricación.

Sensor: presentación en envase de plástico con silicagel. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad un año desde su fabricación.

2.2.- MÉTODOS DE REFERENCIA

Los métodos de referencia son los siguientes:

- Norma UNE-EN ISO 6579 (2003): Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- Norma UNE-EN ISO 6579 (2003). Erratum: 2007 V2. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
- Norma UNE-EN ISO 6579/A1 (2007): Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria.

3.- ESTUDIO DE COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS

Se han realizado los siiguinetes estudios:

- Eficacia relativa (AC), Especificidad relativa (SP) y Sensibilidad relativa (SE).
- Nivel de deteción relativa
- Inclusividad y Exclusividad

3.1.- EFICACIA RELATIVA, ESPECIFICIDAD RELATIVA Y SENSIBILIDAD RELATIVA

3.1.1 Matrices en las que se ha realizado la validación

En el estudio realizado en el año 2013 analizaron 284 muestras, tanto por el método alternativo QFast® como por el método de referencia (UNE-EN ISO 6579 para alimentación animal y cuellos; y UNE-EN ISO 6579/A1 para las muestras ambientales y de producción primaria). En la tabla 1 se establece la distribución de las muestras por categoría.

Tabla 1- Distribución de muestras por categorías en la validación (2013)

Categorías	Muestras positivas [1]	Muestras negativas	Total
1. Veterinaria (heces, calzas y cuellos)	45	74	119
2. Alimentación animal (maíz, centeno y soja)	30	65	95
3. Ambientales (soporte Polvo y fondos)	30	40	70
TOTAL	105	179	284

[1] *Muestras positivas por uno u otro método*

En el estudio de ampliación de la validación realizado en los años 2014 y 2015 se ha procedido a incluir tres categorías de alimentos así como aumentar el número de muestras analizadas en matrices veterinarias y ambientales de producción primaria; y de alimentación animal. En total se han analizado 407 muestras, tanto por el método alternativo QFast® como por el método de referencia (UNE-EN ISO 6579 para alimentos, alimentación animal y cuellos; y UNE-EN ISO 6579/A1 para las muestras ambientales y de producción primaria). En la tabla 2 se establece la distribución de las muestras por categoría.

Tabla 2- Distribución de muestras por categorías (2014-2015)

Categorías	Muestras positivas [1]	Muestras negativas	Total
Veterinaria (heces, calzas y cuellos)	36	25	61
Ambientales (soporte Polvo y fondos)	40	30	70
Alimentación animal (maíz, centeno y soja)	33	30	63
Frutas y hortalizas	46	30	76
Lácteos	42	30	72
Otros (especias, huevos y mayonesa)	37	28	65
TOTAL	234	173	407

[1] *Muestras positivas por uno u otro método*

En el año 2015 se ha procedido a realizar la validación en el grupo de carnes; en total se han analizado 66 muestras tanto por el método alternativo QFast® como por el método de referencia (UNE-EN ISO 6579). En la tabla 3 se establece la distribución de las muestras en el grupo de las carnes.

Tabla 3- Distribución de muestras en el grupo de Carnes

Categorías	Muestras positivas[1]	Muestras negativas	Total
Carnes	36	30	66

[1] *Muestras positivas por uno u otro método*

En la tabla 4 se establece la distribución de las muestras por categoría realizadas en la ampliación del estudio (2014-2015).

Tabla 4- Distribución de muestras por categorías (2014-2015)

Categorías	Muestras positivas [1]	Muestras negativas	Total
Veterinaria (heces, calzas y cuellos)	36	25	61
Ambientales (soporte Polvo y fondos)	40	30	70
Alimentación animal (maíz, centeno y soja)	33	30	63
Alimentos (Frutas y hortalizas, lácteos, otros y cárnicos)	161	118	280
TOTAL	270	203	473

[1] *Muestras positivas por uno u otro método*

3.1.2 Muestras naturales con *Salmonella* spp.

En el estudio realizado en el año 2013 fue necesario trabajar exclusivamente con muestras naturales inoculadas con *Salmonella* spp.

En el estudio de ampliación llevado a cabo durante el periodo 2014-2015, se han analizado 40 muestras naturalmente contaminadas, lo que supone un 17 % sobre el total de las muestras con *Salmonella spp.* analizadas. En el estudio incluyendo las carnes, se han analizado 46 muestras naturalmente contaminadas, lo que supone un 17 % sobre el total de las muestras con *Salmonella* spp.

Cuando no ha sido posible conseguir un número suficiente de muestras naturales con *Salmonella* spp., se ha recurrido a la inoculación de las muestras naturales, tal como se recoge en la UNE-EN ISO 16140.

Siguiendo las indicaciones de la UNE-EN ISO 16140, previo a la inoculación de las muestras naturales se ha procedido a estresar las cepas.

3.1.3 Preparación de la muestra para análisis

La UNE-EN ISO 16140 establece al respecto que el método de referencia y el alternativo a validar deben ser realizados, siempre que sea posible, con la misma muestra. En este caso no es posible y se ha procedido según se describe en el segundo caso del punto 5.1.1.2.3 de la UNE-EN ISO 16140.

3.1.4 Resultados de los ensayos

Los resultados brutos se recogen en el anexo 4.

En las tablas siguientes se recogen los resultados emparejados del método de referencia y alternativo; a partir de ellos se calculan los parámetros sensibilidad relativa (SE), especificidad relativa (SP) y eficacia relativa (AC).

A continuación figuran las definiciones de cada abreviatura:

A+ = Número total de resultados positivos por el método alternativo
A - = Número total de resultados negativos por el método alternativo
R+ = Número total de resultados positivos por el método de referencia
R - = Número total de resultados negativos por el método de referencia

PA = Concordancia de resultados positivos
NA = Concordancia de resultados negativos
PD = Desviación positiva
ND = Desviación negativa

En las tablas que figuran a continuación se recogen los resultados agrupados por categoría y resultados globales.

Tabla 5- Resultados globales (2013)

Todas las matrices		Método ISO 6579 e ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=101**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=1**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=4**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA=178**

Tabla 6- Resultados globales (2014-2015)

Todas las matrices		Método ISO 6579 e ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=229**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=4**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=5**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA=169**

Tabla 7- Resultados globales incluyendo las carnes

Todas las matrices		Método ISO 6579 e ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=363**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=6**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=12**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA=376**

CATEGORÍA 1: MUESTRAS VETERINARIAS

Tabla 8- Resultados de la categoría 1: muestras veterinarias (2013)

Categoría 1: Muestras de producción primaria		Método UNE-EN ISO 6579 y UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=44**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=1**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=1**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA=73**

Tabla 9- Resultados de la categoría 1: muestras veterinarias (2014-2015)

Categoría 1: Muestras de producción primaria		Método UNE-EN ISO 6579 y UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=35**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=1**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA=25**

Tabla 10- Resultados de la categoría 1: muestras veterinarias

Categoría 1: Muestras de producción primaria		Método UNE-EN ISO 6579 y UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=79**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=1**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=2**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA=98**

CATEGORÍA 2: MUESTRAS DE ALIMENTACIÓN ANIMAL

Tabla 11- Resultados de la categoría 2: muestras de alimentación animal (2013)

Categoría 2: Alimentación Animal		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA= 27**	Desviación positiva (R-/A+) **PD= 0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND= 3**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 65**

Tabla 12- Resultados de la categoría 2: muestras de alimentación animal (2015)

Categoría 2: Alimentación Animal		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA= 33**	Desviación positiva (R-/A+) **PD= 0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND= 0**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 30**

Tabla 13- Resultados de la categoría 2: muestras de alimentación animal

Categoría 2: Alimentación Animal		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA= 60**	Desviación positiva (R-/A+) **PD= 0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND= 3**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 95**

CATEGORÍA 3: MUESTRAS DE AMBIENTALES

Tabla 14- Resultados de la categoría 3: muestras ambientales (2013)

Categoría 3: Muestras ambientales		Método UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA= 30**	Desviación positiva (R-/A+) **PD= 0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND= 0**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 40**

Tabla 15- Resultados de la categoría 3: muestras ambientales (2014-2015)

Categoría 3: Muestras ambientales		Método UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA= 38**	Desviación positiva (R-/A+) **PD= 0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND= 2**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 30**

Tabla 16- Resultados de la categoría 3: muestras ambientales

Categoría 3: Muestras ambientales		Método UNE-EN ISO 6579/A1	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA= 68**	Desviación positiva (R-/A+) **PD= 0**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND= 2**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 70**

CATEGORÍA 4: ALIMENTOS EN GENERAL

Tabla 17- Resultados de la categoría 4: Alimentos

Alimentos		Método UNE-EN ISO 6579	
		Método Referencia (R+)	Método Referencia (R-)
Qfast®	Método alternativo positivo (A+)	Concordancia de positivos (A+/R+) **PA=156**	Desviación positiva (R-/A+) **PD=5**
	Método alternativo negativo (A-)	Desviación negativa (A-/R+) **ND=5**	Concordancia de negativos (R-/A-) **NA= 113**

3.1.5 Cálculo e interpretación de los resultados e Intervalos de confianza

Cálculo de la eficacia relativa (AC), especificidad relativa (SP) y sensibilidad relativa (SE).

Los resultados de la validación se recogen en la tabla 18 y tabla 19.

Tabla 18- Resultados de eficacia relativa (AC), especificidad relativa (SP) y sensibilidad relativa (SE)

	NA	ND	PA	PD	Total general	Eficacia	Especificidad	Sensibilidad
Alimentación animal	95	3	60	0	158	98,10%	100,00%	95,24%
Alimentos	113	5	156	5	279	96,42%	95,76%	96,89%
Frutas y hortalizas	30	0	46	0	76	100,00%	100,00%	100,00%
Lácteos	30	0	42	0	72	100,00%	100,00%	100,00%
Otros	24	2	35	4	65	90,77%	85,71%	94,59%
Cárnicos	29	3	33	1	67	93,94%	96,67%	91,67%
Muestras ambientales	70	2	68	0	140	98,57%	100,00%	97,14%
Muestras veterinarias	98	2	79	1	180	98,33%	98,99%	97,53%
Total general	376	12	363	6	757	97,62%	98,43%	96,80%

Tabla 19- Resultados de eficacia relativa *(AC)*, especificidad relativa *(SP)* y sensibilidad relativa *(SE)* en las diferentes categoría estudiadas

	NA	ND	PA	PD	Total general	Eficacia	Especificidad	Sensibilidad
Alimentación animal	**95**	**3**	**60**	**0**	**158**	98,10%	100,00%	95,24%
Alimentos	**113**	**5**	**156**	**5**	**279**	96,42%	95,76%	96,89%
Muestras ambientales	**70**	**2**	**68**	**0**	**140**	98,57%	100,00%	97,14%
Muestras veterinarias	**98**	**2**	**79**	**1**	**180**	98,33%	98,99%	97,53%
Total general	**376**	**12**	**363**	**6**	**757**	97,62%	98,43%	96,80%

Intervalos de confianza

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos de AC, SP y SE *(%)* para todas las categorías con su respectivo límite de confianza inferior *(LCL)* y límite de confianza superior *(LCS)*

Tabla 20- Resultados de AC, SP y SE con su límite de confianza inferior y superior

Matrices	AC *(%)*	LCL *(%)*	SP *(%)*	LCL *(%)*	SE *(%)*	LCL *(%)*
Categoría 1. Muestras veterinarias	98,33	96,66	98,99	97,98	97,53	95,02
Categoría 2. Alimentación animal	98,1	96,2	100	-	95,24	91,73
Categoría 3. Muestras ambientales	98,57	97,14	100	-	97,14	94,71
Categoría 4: Alimentos en general	96,42	93,63	95,76	92,52	96,89	94,35
Todas las categorías	**97,62**	**95,43**	**98,43**	**97,38**	**96,80**	**94,20**

3.1.6 Resultados discordantes

Test estadístico según el anexo F de la norma UNE-EN ISO 16140

La prueba empleada para el estudio de resultados discordantes es:

Tras contar el número total de resultados discordantes de Y de la manera siguiente:

Y= PD + ND

Se comprueba si los dos métodos podrían ser diferentes por el balance de la sensibilidad frente a la especificidad:

- Caso 1: Para Y < 6, menos de 6 resultados discordantes no hay disponible ninguna prueba.
- Caso 2: Para 6 ≤ Y ≥ 22, entre 6 y 22 resultados discordantes, se determina *m* como el valor más pequeño de los dos valores PD y de ND y se emplea la ley binomial conforme a la siguiente tabla 21:

Si m ≤ M para una Y dada, los dos métodos son diferentes a $\alpha < 0{,}05$ (bilateral).

Tabla 21. Determinación de aberrantes para el caso 2.

Valores discordantes Y= PD + ND	6 a 8	9 a 11	12 a 14	15 a 16	17 a 19	20 a 22
M= máx *(m)* para α <0,05	0	1	2	3	4	5

- Caso 3: Para Y > 22, más de 22 resultados discordantes, se emplea el test de MCNemar con la distribución chi-cuadrado para 1 grado de libertad:

$X^2 = d^2/Y$, con d= |PD - ND| e Y= PD + ND

Los dos métodos son diferentes para α <0,05 (bilateral) si $X^2 > 3{,}841$.

En la validación el valor de Y obtenido es de 18 por lo que nos encontramos en el caso segundo donde m es 6 y el valor tabulado de M es 4; por lo que en función de los resultados obtenidos se establece que el método QFast® es equivalente al método de referencia.

Los resultados del test estadístico obtenidos se representan en la siguiente tabla 22.

		Método de referencia Método alternativo Qfast®
Y= ND+PD	Y=12 + 6	Y=18
Conclusión		**Los métodos son equivalentes**

Tras realizar los cálculos establecidos en la UNE-EN ISO 16140 para los parámetros Eficacia relativa, Especificidad relativa y Sensibilidad relativa, así como el estudio de los resultados discordantes, se llega a la conclusión de que ambos métodos *(*referencia y alternativo*)* son iguales y, por lo tanto, los resultados discordantes no ponen en duda la validez del método alternativo.

3.1.6 Estudio de resultados discordantes

Desviaciones negativas *(ND)*

En relación a las desviaciones negativas se han obtenido doce. La información sobre dichas muestras figura en la tabla 23.

Tabla 23- Resultados discordantes obtenidos: desviaciones negativas

Nº muestra	Matriz	Resultado Qfast	Lectura sensor	XLD	ASAP	Resultado ISO 6579/A1 ó ISO 6579
IQ-699	Calzas	Ausencia/ 4 calzas	-	Positivo	No se hizo	Presencia/ 4 calzas
560	Soporte esponja polvo	Ausencia/ soporte	451 nA	Positivo (1 colonia)	Positivo (2 colonias)	Presencia/ soporte
562	Soporte esponja polvo	Ausencia/ soporte	383 nA	Positivo (2 colonias)	Positivo (2 colonias)	Presencia/ soporte
161	Calzas	Ausencia/ 4 calzas	440 nA	Positivo	Negativo	Presencia/ 4 calzas
IQ-149	Cebada	Ausencia/ 25 g	-	Positivo	No se hizo	Presencia/ 25 g
IQ-153	Cebada	Ausencia/ 25 g	-	Positivo	No se hizo	Presencia/ 25 g
IQ-157	Cebada	Ausencia/ 25 g	-	Positivo	No se hizo	Presencia/ 25 g
503	Tabasco	Ausencia/ 25 g	315 nA	Positivo (1 colonia)	Negativo	Presencia/ 25 g
504	Tabasco	Ausencia/ 25 g	748 nA	Negativo	Positivo (bajo crecimiento)	Presencia/ 25 g
1314	Chuletillas	Ausencia/ 25 g	354 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1315	Chuletillas falda	Ausencia/ 25 g	403 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g
1282	Entrecot	Ausencia/ 25 g	596 nA	Positivo	Positivo	Presencia/ 25 g

nA: nano amperiros

Comentarios:

Estudio comparativo 2013

En las muestras IQ-699, IQ-149, IQ-153, IQ-157, analizadas en la validación inicial del método alternativo se ha procedido, con independencia del resultado dado por el lector, a sembrar en una placa de XLD. En las cuatro muestras con desviaciones negativas se ha encontrado crecimiento de colonias características de *Salmonella* en la placa de XLD. Las colonias características de *Salmonella* spp. en el agar XLD tienen un centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador; las variantes de *Salmonella* H_2S negativas que crecen en agar XLD son rosas con un centro rosa más oscuro; y las *Salmonella* lactosa positivas que crecen en agar XLD son amarillas con o sin

ennegrecimiento.

En la muestra IQ-699 se contaminó con la cepa *(CV04)*, esta cepa se empleó al mismo tiempo para inocular otras muestras de la misma matriz de las que se obtuvieron resultados favorables.

Las muestras IQ-149, IQ-153 y IQ-175 se inocularon empleando la cepa *(CV14)*, esta cepa se empleó al mismo tiempo para inocular otras muestras de la misma matriz de las que se obtuvieron resultados favorables.

La morfología de las colonias crecidas en las placas de XLD de las 4 muestras se corresponde con la morofología típica de las cepas inoculadas.

El resultado negativo dado por el lector en las cuatro muestras podría deberse a que, en el momento de la lectura al inocular la gota en el sensor, ésta no haya alcanzado la marca indicada por falta de capilaridad.

Nota validación 2014-2015*: El fabricante del método alternativo ha procedido a realizar la modificación del diseño del lector para subsanar esta desviación.*

Estudio comparativo 2014-2015

En todas las muestras analizadas en la ampliación de la validación del método alternativo se ha procedido, con independencia del resultado dado por el lector, a sembrar en una placa de XLD y ASAP.

Las colonias características de *Salmonella* spp. en el medio cromogénico ASAP son de color rosa/púrpura.

En las dos muestras ambientales *(560, 562)* hubo muy bajo crecimiento de colonias características de *Salmonella* spp. en las dos placas; tras las confirmaciones bioquímicas y serológicas correspondientes se confirmo que eran *Salmonella* spp.
Las muestras se inocularon con 2,7 ufc/ soporte polvo esponja, las características de esta matriz no permiten asegurar la homogeneidad de la contaminación a niveles tan bajos. Por ello, se determina que la cantidad del microorganismo en el momento de la lectura no fue suficiente para que el lector lo detectara y sí, para que 24 horas más tarde, tras la incubación a 37ºC ± 1ª C, el microorganismo se pusiese de manifiesto en las placas de XLD y ASAP.

En la muestra veterinaria *(161)* hubo crecimiento de colonias características de *Salmonella* spp. en el agar XLD y no hubo crecimiento de colonias características en el medio cromogénico ASAP. La ausencia de crecimiento de colonias características en el medio cromogénico ASAP indica una baja concentración de *Salmonella* en la muestra inoculada, lo que ha podido ocasionar el resultado negativo en el método alternativo. La discordancia entre los dos métodos se debe a que el análisis se realiza partiendo de

diferente porción de muestra en ambos métodos.

En las dos muestras de especia tabasco (503 y 504) solamente se han obtenido crecimientos de colonias características de *Salmonella* spp., en una de las dos placas de confirmación; en la muestra 503 solamente había una colonia cartacterística de *Salmonella* spp., confirmada posteriormente mediante pruebas bioquímicas y serológicas apropiadas, en la placa de XLD. En la muestra 504 solo se ha obtenido un bajo crecimiento de *Salmonella* spp., confirmada posteriormente mediante pruebas bioquímicas y serológicas apropiadas, en la placa de ASAP. Ambas muestras se inocularon empleando la cepa (CV14), esta cepa se utilizó en el estudio de inclusividad, siendo satisfactorio.

La especia Chile Tabasco y el ajo, presentan sustancias naturales con efectos antimicrobianos. La norma UNE-EN ISO 6887-4: 2003 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico" establece que la preparación de las muestras de especias para su posterior análisis microbiológico por métodos ISO, requiere la adición de sulfito potásico al diluyente agua de peptona (APT) con el fin de disminuir la actividad antimicrobiana de sustancias inhibidoras que contienen este tipo de matrices. Dicha adición se realizó en las muestras de Tabasco para su posterior análisis por el método de referencia pero no para las muestras analizadas por el método alternativo. Esto explica que en las dos muestras de tabasco por el método alternativo se hayan obtenido falsos negativos. A raíz de dichos resultados el protocolo del método debe incluir que para el caso de este tipo de muestras su preparación se realizará siguiendo las indicaciones de la norma UNE-EN ISO 6887-4.

Estudio comparativo 2014-2015 (ampliación matriz carnes)

Las tres muestras de cárnicos indicadas con desviaciones negativas, se presentaban envasadas en atmósfera modificada, lo que minimiza la proliferación de la carga microbiana. En este tipo de muestras, con carga microbiana no excesivamente alta, en las que se emplea el medio hard como pre-enriquecimiento, la *Salmonella* spp. puede quedar metabólicamente inactiva por el potente efecto inhibidor del medio. Esto provocaría que la reacción enzimática no se produzca en el momento de la lectura en el sensor, dando una lectura negativa pero produciéndose posteriormente el crecimiento de Salmonella spp. en las placas de XLD y ASAP.

Desviaciones positivas *(PD)*

En relación a las desviaciones positivas se han obtenido seis: una en la matriz heces, cuatro de ellas en matrices de especias y otra en un morcillo de vacuno. La información sobre dichas muestras figura en la tabla 24.

Tabla 24- Resultados discordantes obtenidos: desviaciones positivas

Nº muestra	Matriz	Resultado 9fast	Lectura sensor	XLD	ASAP	Resultado ISO 6579/A1 ó ISO 6579
IQ-180	Heces	Presencia / 25 g	-	Positivo	-	Ausencia / 25 g
204	Ajo granulado	Presencia / 25 g	3440 nA	Negativo	Negativo	Ausencia / 25 g
205	Ajo granulado	Presencia / 25 g	6910 nA	Negativo	Negativo	Ausencia / 25 g
208	Sazonador de carne	Presencia / 25 g	1730 nA	Negativo	Negativo	Ausencia / 25 g
282	Sazonador de ensalasa	Presencia / 25 g	1,75 uA	Negativo	Negativo	Ausencia / 25 g
1285	Morcillo de vacuno	Presencia / 25 g *(1)*	1,66 uA	Negativo	Negativo	Ausencia / 25 g

nA: nano amperiros

uA: microamperios

(1) La indentificación posterior con API 20E.

Comentarios*:*

Estudio comparativo 2013

En relación análisis IQ-180 en heces, la confirmación realizada es crecimiento en placa de XLD; en este caso las colonias crecidas eran similares a colonias características de *Salmonella*, pudiendo llegar a ser un verdadero positivo. El resultado discordante con el método alternativo se debe a la heterogeneidad de la muestra, ya que ambos métodos parten de una porción distinta.

Estudio comparativo 2014-2015

En relación a las desviaciones positivas que se han obtenido en las especias *(*204, 205, 208 y 282*)*, no ha habido crecimiento de colonias características ni en el agar XLD ni en el medio cromogénico ASAP.

Las especias son matrices complejas que por sus características intrínsecas pueden dar lugar inicialmente a falsos postivos; tras la confirmación obligatoria se conluyo que eran presuntos positivos negativos confirmados.

Estudio comparativo 2014-2015 (ampliación matriz carnes)

En relación a la desviación positiva que se ha obtenido en la muestra de Morcillo de vacuno, no ha habido crecimiento de colonias características ni en XLD ni ASAP; no obstante, se procedió a la identificación de las colonias presentes en ambas placas mediante la galería bioquímica API 20E obteniéndose la identificación siguiente:

- Placa XLD:
    a. colonias amarillas *Enterobacter cloacae*
- Placa ASAP:
    a. colonias turquesas: *Enterobacter cloacae*

En el estudio de exclusividad se analizó la cepa de colección *Enterobacter cloacae* (CECT 194) la cual presento ausencia en el medio solft y hard. En este caso la cepa identificada en ambos medios es una cepa salvaje presente de forma natural en la muestra analizada de morcillo de vacuno; puede ser que en este caso la cepa salvaje se haya comportado de forma diferente a la cepa de colección.

No obstante, tras la confirmación obligatoria se concluyó que era un resultado presunto positivo negativo confirmado.

3.2.- LÍMITE DE DETECCIÓN RELATIVO (LDR)

El nivel de detección relativa se corresponde con el menor número de microorganismos cultivables que pueden ser detectados en la muestra, con una probabilidad de 50%, mediante los dos métodos, alternativo y de referencia. Las contaminaciones artificiales se realizaron de acuerdo a los requisitos de la norma UNE-EN ISO 16140, ya descritos anteriormente.

La determinación del límite de detección relativo se ha realizado de nuevo en la validación llevada a cabo en los años 2014-2015. Para ello se someten a estudio siete matrices diferentes, cada una englobada en una categoría. Para cada una de las categorías se emplea un microorganismo diana diferente.

Se han empleado 4 niveles, como mínimo, de microorganismo diana por matriz, incluyendo el control negativo. El análisis se realiza seis veces por ambos métodos, alternativo y de referencia.

Estas matrices así como las cepas de *Salmonella* spp. han sido:

- Heces: *Salmonella typhimurium*
- Soporte polvo: *Salmonella london*
- Lacteos (leche cruda): *Salmonella dublin*
- Huevos frescos: *Salmonella enteritidis*
- Vegetales (fruta): *Salmonella virchow*
- Maíz: *Salmonella derby*
- Carnes: *Salmonella arizonae*

3.2.1 Protocolo de contaminación

La UNE-EN ISO 16140 establece al respecto que el método de referencia y el alternativo a validar deben ser realizados, siempre que sea posible, con la misma muestra. En este caso no es posible y se ha procedido según se describe en el segundo caso del punto 5.1.1.2.3 de dicha UNE.

3.2.2 Resultados

Los resultados brutos se recogen en el anexo 7.
Los resultados de límite de detección figuran a continuación, habiéndose calculado según el test de Spearman–Kärber[1].

1 "Hitchins A. Proposed Use of a 50 % Limit of Detection value in Definig Uncertainty Limits in the Validation of presence-Absence Microbial Detection Methods. Draft 10th December, 2003".

Tabla 25- Estudio límite de detección: Resultados obtenidos en Heces con *Salmonella typhimurium*

MATRIZ		Qfast® (ufc/ 25)	UNE-EN ISO 6579/A1 (ufc/ 25 g) ó UNE-EN ISO 6579 (ufc/ 25 g)
HECES	Límite de detección relativo Intervalo	0,8 0,42-1,50	1,38 0,98-1,90
SOPORTE POLVO	Límite de detección relativo Intervalo	0,46 0,18-1,15	0,61 0,27-1,38
FRUTA	Límite de detección relativo Intervalo	0,8 0,48-1,32	0,22 0,15-0,35
HUEVOS	Límite de detección relativo Intervalo	0,85 0,55-1,30	0,3 0,20-0,50
LECHE CRUDA	Límite de detección relativo Intervalo	0,48 0,28-0,80	0,35 0,28-0,45
FILETE DE VACUNO	Límite de detección relativo Intervalo	0,65 0,40-1,02	0,4 0,22-0,72
MAIZ	Límite de detección relativo Intervalo	0,4 0,25-0,625	0,4 0,25-0,625

Conclusiones:

El método alternativo y el método de referencia presenten límites de detección relativa similares.

En el límite de detección realtivo en el método alternativo está comprendido entre 0,18 y 1,5 ufc y en el caso del método de referencia entre 0,15 y 1,9 ufc.

3.3.- INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

La inclusividad es la capacidad del método alternativo para detectar el analito diana entre un amplio grupo de cepas. El objetivo del estudio es verificar que todas las cepas son detectadas por el método alternativo. Al poseer dos medios de cultivo uno para matrices simples (Soft) y otro para matrices complejas (Hard) se procede a hacer el estudio para ambos medios.

La exclusividad es la ausencia de interferencia en el método alternativo de un grupo adecuado de cepas no diana. El objetivo del estudio es verificar que las cepas no diana no son detectadas por el método alternativo y así verificar la selectividad del método alternativo. Al igual que la inclusividad se procede a realizar el estudio con ambos medios.

3.3.1 Protocolo de ensayo

Las cepas elegidas para dicho estudio se encuentran en forma de criobolas, las cuales se dejan crecer en caldo BHI a 37ºC durante 24h. Una vez pasado este tiempo se realizan las diluciones decimales correspondientes en maximum recovery diluent (MRD), y se añade a 225 ml del medio correspondiente 0,3 ml de la dilución adecuada. Para controlar el inóculo añadido en la muestra se siembra 1 ml de la dilución correspondiente en 5 placas de PCA y se incuban durante 72h a 30ºC.

3.3.2 Resultados y conclusión

Los estudios de inclusividad y exclusividad se llevaron a cabo en el estudio inicial en el año 2013 y se ampliaron en el estudio llevado a cabo en los años 2014-2015. Los resultados de la Inclusividad y exclusividad, tanto en el medio Hard como en el medio Soft, figuran en el Anexo 5 para la Exclusividad y Anexo 6 para la Inclusividad.

<u>Validación inicial (2013):</u>

De las 30 cepas diana inoculadas en el medio1 Soft: los resultados han sido todos favorables en todas ellas. Todas las cepas no diana inoculadas en el medio han resultado negativas.

De las 30 cepas diana inoculadas en el medio1 Hard: los resultados han sido todos favorables en todas ellas. Todas las cepas no diana inoculadas en el medio han resultado negativas.

<u>Ampliación de la validación (2014-2015)</u>

Los resultados obtenidos son favorables tanto en el medio Hard como en el medio soft, tanto para la inclusividad como para la exclusividad.

4.-ESTUDIO COLABORATIVO 2014

Dentro la validación inicial en el año 2013 se llevó a cabo un ejercicio colaborativo empleando muestras de heces. En este ejercicio participaron 14 laboratorios. En el año 2014 y dentro de la ampliación de la validación a muestras de alimentación humana, se consideró necesario realizar un segundo ejercicio colaborativo. En este ejercicio se realizo en leche en polvo y participaron 11 laboratorios.

4.1.- ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio del ejercicio colaborativo se organizó en noviembre y diciembre de 2014. El número de laboratorios participantes fueron 11.

El cronograma del colaborativo fue el que se detalla a continuación:

- 18-21 noviembre 2014: Recepción de las muestras de leche en polvo en el laboratorio
- Semana del 24 de noviembre 2014: inicio ensayos lote A (Muestras M1 a M12)
- Semana del 1 de diciembre 2014: inicio ensayos lote B (Muestras M13 a M24)

No se produjeron incidencias en el cronograma previsto.

4.1.1.-Naturaleza de las preparaciones

Se seleccionó una muestra procedente de un único lote, consistente en leche en polvo desnatada.

Sobre esta muestra se verificó la ausencia de *Salmonella* spp., mediante la aplicación del método de referencia (UNE-EN ISO 6579). En estos ensayos no se halló presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras analizadas.

De forma previa a los envíos se prepararon cantidad suficiente de envases de leche en polvo desnatada para permitir la adición de forma previa a la expedición de una cantidad de inóculo de *Salmonella* spp. preparado sobre leche en polvo, obteniendo un peso final de 25 gramos.

4.1.2.-Tasa de inoculación

Las muestras se inocularon en tres niveles diferentes:

Tabla 26- Niveles de inóculo de *Salmonella* spp.

Nivel	Recuento medio de *Salmonella* spp. en 25 g
L0	0
L1	35 ufc
L2	76 ufc

Los inóculos fueron preparados, con la adición de *Salmonella entérica* perteneciente a la CECT 4594.

Las pruebas de estabilidad realizadas durante el periodo de realización del ensayo confirmaron la supervivencia del microorganismo en todas las muestras analizadas que habían sido inoculadas.

4.1.3.-Problemas con la temperatura en el transporte y a la hora de la recepción

Las muestras se codificaron de M1 a M24, recibiendo cada laboratorio dos envases de cada código, empleándose aleatoriamente para su ensayo por el método de referencia o por el método alternativo.

Las muestras e inóculos a enviar a los laboratorios fueron almacenados en congelación a *(-30ºC)* hasta su expedición, y confirmada la estabilidad de los inóculos cuando éstos se mantienen en refrigeración durante un periodo de 2 semanas.

Las muestras fueran enviadas el 17 de noviembre, en paquete isotermo con nieve carbónica, y recibidas en todos los laboratorios el 18 de noviembre. Todas las preparaciones llegaron a tiempo.

Los laboratorios debían mantener las muestras e inóculos en refrigeración hasta comenzar los ensayos: a partir del 24 de noviembre para los códigos M1 a M12, y a partir del 1 de diciembre para los códigos M13 a M24.

Los códigos correspondientes a los inóculos y su nivel correspondiente de contaminación fueron los indicados en la Tabla 27.

Tabla 27- Códigos de las muestras y su nivel de inoculación

Nivel de Contaminación	Códigos de muestras
L0	M1, M2, M7, M8, M13, M14, M19, M20
L1	M3, M4, M5, M6, M9, M10, M11, M12
L2	M15, M16, M17, M18, M21, M22, M23, M24

4.2.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

El resumen de los resultados obtenidos por los laboratorios se muestra en la tabla 28.

Tabla 28- Coincidencia de resultados para cada uno de los métodos aplicados y nivel de inoculación

Laboratorio	Método alternativo			Método de referencia		
	Nº Muestras positivas			Nº Muestras positivas		
	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2
1	0 / 8	8 / 8	7 / 8	1 / 8	8 / 8	8 / 8
2	3 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
3	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
4	0 / 8	8 / 8	7 / 8	4 / 8	8 / 8	8 / 8
5	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
6	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
7	0 / 8	6 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
8	2 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
9	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
10	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
11	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
	FP	TP	TP	FP	TP	TP
	5	86	86	5	88	88
N	88	88	88	88	88	88

FP: Número de falsos positivos
TP: Número de verdaderos positivos
N: Número de análisis realizados en cada nivel

4.3.- CÁLCULOS

4.3.1.- CÁLCULO DE LOS PORCENTAJES DE ESPECIFICIDAD (SP), SENSIBILIDAD (SE) Y EFICACIA RELATIVA (AC)

Cálculos de Especificidad (SP) y Sensibilidad (SE)

Los valores de especificidad y sensibilidad de ambos métodos se presentan en la tabla 29, incluyendo el valor del límite inferior (LCL).

Para el cálculo de la especificidad y sensibilidad se emplean las fórmulas siguientes.

Para el nivel L0:

$$SP = \left[1 - \left(\frac{FP}{N}\right)\right] * 100\ \%$$

Para los niveles L1 y L2:

$$SE = \left(\frac{TP}{N}\right) * 100\ \%$$

Siendo:

FP: Falsos positivos
TP: Verdaderos positivos
N: número de muestras

Tabla 29: Especificidad (SP) y Sensibilidad (SE) del método alternativo y de referencia

	Método alternativo QFast®	LCL	Método de Referencia UNE-EN ISO 6579	LCL
Especificidad (SP)				
SP (Nivel L0)	94,32%	89,38%	94,32%	89,38%
Sensibilidad (SE)				
SE (Nivel L1)	97,73%	94,55%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L2)	97,73%	94,55%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L1+L2)	97,73%	95,48%	100,00%	100,00%

Cálculos de la Exactitud Relativa *(AC)*

Para cada nivel de contaminación y la totalidad de los resultados, se compara el método alternativo y el método de referencia con el objeto de calcular la eficacia relativa y estudiar los resultados discordantes.

La comparación de los pares de resultados de los diferentes niveles de contaminación se resume en la tabla 30.

Tabla 30: Resultados obtenidos por ambos métodos

Nivel	Método Alternativo QFAST® *Salmonella*	Método de Referencia UNE-EN ISO 6579		
		Muestras Positivas	Muestras Negativas	Total
Nivel L0	Muestras Positivas	PA= 0	PD= 5	5
	Muestras Negativas	ND= 5	NA= 78	83
	Total	5	83	88
Nivel L1	Muestras Positivas	PA= 86	PD=0	86
	Muestras Negativas	ND= 2	NA= 0	2
	Total	88	0	88
Nivel L2	Muestras Positivas	PA= 86	PD= 0	86
	Muestras Negativas	ND= 2	NA= 0	2
	Total	88	0	88
Nivel L1+2	Muestras Positivas	PA= 172	PD= 0	172
	Muestras Negativas	ND= 4	NA= 0	4
	Total	176	0	176

Nota-PA: concordancias positivas; NA: concordancias negativas; ND: desviaciones negativas; PD desviaciones positivas.

Los valores de la eficacia relativa *(AC)* para los diferentes niveles de contaminación, se presentan en la tabla 31, junto con los correspondientes intervalos de confianza *(LCS y LCL)*.

La eficacia relativa se calcula según la siguiente fórmula:

$$AC = \frac{PA + NA}{N} * 100\ \%$$

Siendo:

PA: Número de concordancias positivas
NA: Número de concordancias negativas
N: Número total de muestras analizadas

Tabla 31: Valores de Eficacia relativa (AC) e intervalos de confianza

Nivel	Parámetro de evaluación	Resultado
Nivel 0	AC	89,64%
	LCS	95,40%
	LCL	81,87%
Nivel 1	AC	97,73%
	LCL	94,55%
Nivel 2	AC	97,73%
	LCL	94,55%
Nivel 1+2	AC	97,73%
	LCL	95,48%

4.3.2.- ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES

Se examinan los resultados discordantes con el Test estadístico según se describe en el anexo F de la norma UNE-EN ISO 16140.

Los resultados del test estadístico obtenidos se representan en la siguiente tabla 32.

		Método de referencia
		Método alternativo Qfast®
Nivel 0	Y= ND+PD	Y=10
	Conclusión	m valor más pequeño de PD y ND es 5 *(m)* M=1 para Y de 9 a 11 Los métodos se consideran equivalentes *(m>M)*
Nivel 1	Y= ND+PD	Y=2 *(Y<6)*
	Conclusión	No se dispone de test estadístico. Los métodos se consideran equivalentes
Nivel 2	Y= ND+PD	Y=2 *(Y<6)*
	Conclusión	No se dispone de test estadístico. Los métodos se consideran equivalentes
Nivel 1 + Nivel 2	Y= ND+PD	Y=4 *(Y<6)*
	Conclusión	No se dispone de test estadístico. Los métodos se consideran equivalentes

El método Qfast Salmonella y el método de referencia UNE-EN ISO 6579 se consideran equivalentes.

Estudio de las desviaciones

Falsos positivos

En el nivel 0 se detectaron 5 falsos positivos con el método alternativo y otros 5 falsos positivos con el método de referencia ISO.

Los 5 falsos positivos obtenidos por el método de referencia se han dado en las siguientes muestras de los laboratorios indicados:

Laboratorio 1, muestra M19: el laboratorio emite el resultado como Presencia *Salmonella* spp., tras confirmación por las pruebas bioquímicas correspondientes.

Laboratorio 4, muestras M2, M7, M8 y M14: el laboratorio emite el resultado como Presencia *Salmonella* spp., tras confirmación por las pruebas bioquímicas correspondientes.

Los 5 falsos positivos obtenidos por el método alternativo se han dado en las siguientes muestras de los laboratorios indicados:

Laboratorio 2, muestras M7, M8 y M20.
Laboratorio 8, muestras M19 y M20.

Las confirmaciones bioquímicas realizadas por los laboratorios participantes permiten atribuir los 10 falsos positivos a contaminaciones cruzadas.

El laboratorio 1 indica en el apartado de observaciones cuando entrega los resultados al organizador del ejercicio colaborativo "que ha podido haber una contaminación cruzada a la hora de procesar las muestras".

Teniendo en cuenta que el mismo laboratorio ha obtenido un falso negativo (sin crecimiento en ninguna de las dos placas) en la muestra M24, procesada en el mismo día, se considera la posibilidad de que el laboratorio intercambiara las muestras.

Falsos negativos

En el nivel 1 se detectaron dos falsos negativos con el método alternativo y en el nivel 2 otros dos falsos negativos con el método alternativo.

Los 4 falsos negativos obtenidos por el método alternativo se han dado en las siguientes muestras de los laboratorios indicados:

Nivel 1: dos muestras en el laboratorio 7: M6 y M12.

Nivel 2: una muestra en el laboratorio 1 (M24) y otra muestra en el laboratorio 4 (M24).

En relación al resultado obtenido por el laboratorio 1 para el nivel 2 en la muestra M24, el sensor indico ausencia de *Salmonella* spp. y tampoco hubo crecimiento de colonias en la placa de XLD (no emitio resultados de crecimiento en un segundo medio). Teniendo en cuenta que el mismo laboratorio ha obtenido un falso positivo (con crecimiento en las dos placas y confirmación bioquímica) en la muestra M19, procesada en el mismo día, se considera la posibilidad de que el laboratorio haya intercambiado las muestras.

En relación a los resultados de las dos muestras del laboratorio 7 para el nivel 1: los resultados obtenidos en la lectura del sensor corresponden a ausencia de *Salmonella* spp.; en las dos placas empleadas se obtuvo crecimiento de colonias características de *Salmonella* spp. EL laboratorio indica que en el caso de estas dos muestras tuvo una incidencia durante la incubación en la primera etapa del Qfast, no cumpliendo el rango de temperatura de 37ºC ± 1ºC durante todo el tiempo establecido. Esta desviación durante la incubiación explica que no se haya alcanzado el número de microorganismos necesarios para la detección por sensor. La incubación posterior del inóculo en las placas de XLD y ASAP, así como las pruebas bioquímicas realizadas confirma la presencia de *Salmonella* spp.

En relación al resultado obtenido por el laboratorio 4 para el nivel 2 en la muestra M24, el sensor indico ausencia de *Salmonella* spp y si hubo crecimiento de colonias características en la placa de XLD y en el segundo medio. El laboratorio ha dado resultados correctos en todas las muestras inculadas con *Salmonella* spp salvo en esta muestra de la segunda tanda. En este caso laboratorio no aporta información adicional que permita establecer la causa de esta desviación negativa.

4.4- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO COLABORATIVO Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS

4.4.1. COMPARCIÓN DE LOS VALORES DE LA EFICACIA RELATIVA (AC), ESPECIFICIDAD RELATIVA (SP) Y SENSIBILIDAD RELATIVA (SE)

En la tabla 33 se recogen los resultados obtenidos en el ejercicio colaborativo en leche en polvo y en la validación global.

Tabla 33. Comparación del estudio colaborativo en leche en polvo y comparación de métodos

	Estudio colaborativo	Estudio comparativo
Eficacia relativa (AC)	93,68 %	97,62 %
Sensibilidad relativa (SE)	97,73 %	96,80 %
Especificidad relativa (SP)	94,32 %	98,43 %

4.4.2.- CONFORMIDAD, CONCORDANCIA Y OPORTUNIDAD RELATIVA DE CONCORDANCIA (COR)

La **Conformidad** es la probabilidad porcentual de encontrar el mismo resultado en dos porciones analíticas idénticas (ambas positivas o ambas negativas), en el mismo laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad.

Para encontrar este término de los datos obtenidos en un colaborativo, la probabilidad de que dos muestras den el mismo resultado se calcula para cada laboratorio participante. Una vez obtenidas las probabilidades se promedian.

La **concordancia** es la probabilidad porcentual de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas analizadas por diferentes laboratorios.

Para su cálculo se toma a su vez cada replicado de cada laboratorio, pareándolo con resultados idénticos del resto de laboratorios. La concordancia es el porcentaje de todos los datos emparejados del mismo resultados sobre todos los pares de datos posibles.

La **oportunidad relativa de concordancia**: Aunque en un método cualitativo, es difícil calcular el grado de variación colaborativo, al estar la conformidad y la concordancia fuertemente influidas por el grado de eficacia, puede calcularse la llamada oportunidad relativa de concordancia (COR), calculada según la ecuación:

$$COR = \frac{Conformidad * (1 - Concordancia)}{Concordancia * (1 - Conformidad)}$$

Si la concordancia es más pequeña que la conformidad, indica que dos muestras idénticas tienen más posibilidades de dar el mismo resultado si son analizadas por el mismo laboratorio que si son analizadas por laboratorios diferentes, sugiriendo que puede haber una variabilidad en el rendimiento entre laboratorios.

En la tabla 34 se recogen los resultados obtenidos en el colaborativo realizado con leche en polvo

Tabla 34: Resultados de conformidad, concordancia y oportunidad relativa de concordancia en el colaborativo de leche en polvo

	QFast® *Salmonella*			**UNE-EN ISO 6579**		
Nivel	**Conformidad**	**Concordancia**	**COR**	**Conformidad**	**Concordancia**	**COR**
Nivel 0	92,33%	88,98%	1,49	93,47%	88.86%	1,79
Nivel 1	96,59%	95,45%	1,35	100,00%	100,00%	1,00
Nivel 2	96,02%	95,51%	1,13	100,00%	100,00%	1,00

Conclusiones:

Los resultados de eficacia, selectividad y sensibilidad obtenidos en el estudio colaborativos son buenos, todos ellos por encima del 90%. El hecho de que la sensibilidad sea mayor que la especificidad se debe a que en el ejercicio se han producido más falsos positivos que negativos (5 falsos positivos frente a 4 falsos negativos).
Esto explica también, que el grado de correspondencia entre la respuesta del método alternativo y del método de referencia es mejor para las muestras inculadas con una eficacia (AC) de 97,73% que para las muestras no inoculadas con una eficacia (AC) de 89,64%,

Al ser la concordancia más péqueña que la confomidad, la probabilidad indica que dos muestras idénticas tienen más posibilidades de dar el mismo resultado si son analizadas por el mismo laboratorio que si son analizadas por laboratorios diferentes.

Las desviaciones positivas producidas en ambos métodos en el nivel 0 se manifiestan en los valores de COR, estos valores son elevados en ambos métodos e indican una variación interlaboratorio alta, debida en este caso a las contaminaciones cruzadas.

En la detección de muestras inoculadas no se aprecia una influencia significativa en la variabilidad interlaboratorio ya que la COR es próxima a 1.

De acuerdo con el estudio estadístico de resultados discordantes se concluye que los métodos son equivalentes entre si.

5.-ESTUDIO COLABORATIVO 2013

5.1.- ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio del ejercicio colaborativo se organizó en septiembre de 2013. El número de laboratorios participantes fueron 14.

El cronograma del colaborativo fue el que se detalla a continuación:

- 11-12 septiembre 2013: Recepción de las muestras de heces en el laboratorio
- Semana del 16 de septiembre 2013: inicio ensayos lote A Heces. (Muestras H1 a H12)
- Semana del 23 de septiembre 2013: inicio ensayos lote B Heces. (Muestras H13 a H24)

No se produjeron incidencias en el cronograma previsto.

5.1.1.-Naturaleza de las preparaciones

Se seleccionó una muestra procedente de un único lote, consistente en heces de granja de producción ecológica, que fue sometida a un proceso de deshidratación.

Sobre esta muestra se verificó la ausencia de *Salmonella* spp., mediante la aplicación del método de referencia. En estos ensayos no se halló presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas.

Se dispone de datos de contaminación natural de las heces obtenido mediante recuento de enterobacterias en VRBG con resultado de 1,9 x 10^6 ufc/g.

La muestra de heces fue envasada en alícuotas de unos 6 gramos, en frasco anaclín estéril (para realizar en ensayo por el método alternativo QFast®) y en bolsa estéril (para analizar por el método de referencia), con el objetivo de facilitar la manipulación de la misma. Estas muestras debían ser rehidratadas según las instrucciones que acompañaban a las muestras inmediatamente antes de ser analizadas.

Al mismo tiempo, se preparó leche en polvo, como sustrato de inoculación de la *Salmonella*. La ausencia de *Salmonella* spp. sobre la leche en polvo, también fue comprobada.

5.1.2.-Tasa de inoculación

El inoculo de leche en polvo que debía ser empleado por los laboratorios para adicionar a las heces, fue preparado de manera que proporcionase tres niveles diferentes:

Tabla 35- Niveles de inóculo de *Salmonella* spp.

Nivel	Recuento medio de *Salmonella* spp. En 25 g	Intervalo de confianza (ufc/ 25 g)
L0	0	-
L1	49 ufc	[34-70]
L2	130 ufc	[90-190]

Los inóculos fueron preparados, con la adición de *Salmonella* entérica perteneciente a la CECT 4594.

Las pruebas de estabilidad realizadas durante el periodo de realización del ensayo confirmaron la supervivencia del microorganismo en todas las muestras analizadas que habían sido contaminadas.

5.1.3.-Problemas con la temperatura en el transporte y a la hora de la recepción.

No se registró ningún problema a la hora del transporte de las muestras a los distintos laboratorios.

Por otro lado en algunos laboratorios la solución de reacción del método alternativo QFast® la cual se debe de conservar a temperaturas de -21 y -5ºC, no llegó a esas temperaturas y/o en el laboratorio se almacenó a temperaturas de refrigeración en vez de congelación.

5.2.- RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

El resumen de los resultados obtenidos por los laboratorios se muestra en la tabla 36. Los resultados mostrados por el método alternativo son después de la confirmación.

Tabla 36- Coincidencia de resultados para cada uno de los métodos aplicados y nivel.

Laboratorio	Método alternativo QFAST			Método de referencia UNE-EN ISO 6579/A1		
	Nº Muestras positivas			Nº Muestras positivas		
	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2
1	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
2	0 / 6	2 / 2	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
3	2 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
4	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
5	0 / 8	8/ 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
7	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
8	4 / 8	7 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
10	1 / 8	5 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
11	0 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
12	2 / 8	7 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
13	3 / 8	8 / 8	7 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
15	2 / 8	8 / 8	8 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
16	1 / 8	8 / 8	7 / 8	0 / 8	8 / 8	8 / 8
	FP	TP	TP	FP	TP	TP
	15	93	102	0	104	104
N	102	98	104	104	104	104

- El laboratorio nº 6 y 9 no participaron finalmente en el estudio colaborativo de heces.
- El laboratorio nº 2, no analizó todas las muestras debido a una desconfiguración del lector, según declara el participante.
- El laboratorio nº 14 fue excluido de la interpretación

FP: Número de falsos positivos
TP: Número de verdaderos positivos
N: Número de análisis realizados en cada nivel

5.3.- CÁLCULOS

5.3.1.- CÁLCULO DE LOS PORCENTAJES DE ESPECIFICIDAD (SP), SENSIBILIDAD (SE) Y EFICACIA RELATIVA (AC)

Cálculos de la Especificidad (SP) y Sensibilidad (SE)

Los cálculos de especificidad y sensibilidad de ambos métodos se presentan en la tabla 37, incluyendo el intervalo superior (LCS) e inferior (LCL), para los valores obtenidos inferiores al 90%, según aplique.

Para el nivel L0:

$$SP = \left[1 - \left(\frac{FP}{N}\right)\right] * 100\ \%$$

Para los niveles L1 y L2:

$$SE = \left(\frac{TP}{N}\right) * 100\ \%$$

Siendo:

FP: Falsos positivos
TP: Verdaderos positivos
N: número de muestras

Tabla 37: Especificidad (SP) y Sensibilidad (SE) de los métodos alternativo y de referencia.

Especificidad/ Sensibilidad	Método alternativo QFast®	LCS	LCL	Método de Referencia UNE-EN ISO 6579/A1	LCL
SP (Nivel L0)	85,15%	93,4%	76,90%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L1)	94,90%	-	90,45%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L2)	98,08%	-	95,38%	100,00%	100,00%
SE (Nivel L1+L2)	96,53%	-	93,96%	100,00%	100,00%

Cálculos de la Exactitud Relativa *(AC)*

La comparación de los pares de resultados de los diferentes niveles de contaminación se resume en la tabla 38.

Tabla 38: Resultados obtenidos por ambos métodos

Nivel	Método Alternativo QFAST® *Salmonella*	Método de Referencia UNE-EN ISO 6579/A1		
		Muestras Positivas	Muestras Negativas	Total
Nivel L0	Muestras Positivas	PA= 0	PD= 15	15
	Muestras Negativas	ND= 0	NA= 87	87
	Total	0	102	102
Nivel 1	Muestras Positivas	PA= 93	PD=0	93
	Muestras Negativas	ND= 5	NA= 0	5
	Total	98	0	98
Nivel 2	Muestras Positivas	PA= 102	PD= 0	102
	Muestras Negativas	ND= 2	NA= 0	2
	Total	104	0	104
Nivel 1+2	Muestras Positivas	PA= 195	PD= 0	195
	Muestras Negativas	ND= 7	NA= 0	7
	Total	202	0	202

Nota-PA: concordancias positivas; NA: concordancias negativas; ND: desviaciones negativas; PD desviaciones positivas.

Los valores de la eficacia relativa *(AC)* para los diferentes niveles de contaminación, se presentan en la tabla 39, junto con el correspondiente límite inferior crítico LCL.

La eficacia relativa se calcula según la siguiente fórmula:

$$AC = \frac{PA + NA}{N} * 100\ \%$$

Siendo:

PA: Número de concordancias positivas
NA: Número de concordancias negativas
N: Número total de muestras analizadas

Tabla 39: Valores de Eficacia relativa (AC) e intervalos de confianza

Nivel	Parámetro de evaluación	Resultado
Nivel 0	**AC**	85,15%
	LCS	93,40%
	LCL	76,9%
Nivel 1	**AC**	94,32%
	LCL	89,38%
Nivel 2	**AC**	96,00%
	LCL	92,08%
Nivel 1+2	**AC**	95,21%
	LCL	92,10%

5.3.2.- ESTUDIO DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES

Falsos positivos

Los participantes no tenían amplia experiencia en el desarrollo de dicho método. Dicha falta de experiencia ha podido provocar una contaminación cruzada entre las muestras dopadas con las muestras no dopadas (posiblemente en el momento de la lectura cuando el sensor se sujeta con los dedos). La práctica, experiencia y la habilidad en el desarrollo del procedimiento evita este problema.

Nota ampliación 2014-2015*: Los laboratorios seleccionados tenían competencia técnica para la ejecución de ambos métodos (referencia y alternativo), tal como lo demuestran los resultados obtenidos. El nivel de experiencia indicado en el párrago anterior no pone en duda la competencia técnica de los laboratorios colaboradores.*

Falsos negativos

El laboratorio ante estos resultados discordantes (negativos) procedió a realizar la correspondiente investigación de las posibles causas llegando a la conclusión de que el resultado negativo dado por el lector en dichas muestras contaminadas artificialmente podría deberse a que en el momento de inocular la gota en el sensor no haya alcanzado la marca indicada por falta de capilaridad.

Nota 2014-2015*: Estas desviaciones fueron comunicadas al fabricante, el cual adopto las acciones necesarias mejorando el diseño del sensor que evitan los problemas de falta de capilaridad. Esta actuación se llevó a cabo una vez finalizado el informe de validación, por lo que no se reflejó en el mismo.*

5.4- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO COLABORATIVO Y COMPARACIÓN DE MÉTODOS

5.4.1. COMPARCIÓN DE LOS VALORES DE LA EFICACIA RELATIVA (AC), ESPECIFICIDAD RELATIVA (SP) Y SENSIBILIDAD RELATIVA (SE)

En la tabla 40 se recogen los resultados obtenidos en el ejercicio colaborativo en heces y en la validación inicial.

Tabla 40. Comparación del estudio colaborativo y comparación de métodos inicial

	Estudio colaborativo Heces	Estudio comparativo de los métodos 2013
Eficacia relativa (AC)	96,53%	98,3%
Sensibilidad relativa (SE)	96,53%	99,7%
Especificidad relativa (SP)	85,71%	96,00%

En los datos recogidos en dicha tabla se aprecia que los valores de AC, SE y SP son más altos en el estudio comparativo que en el estudio colaborativo. La mayor experiencia del laboratorio organizador en la realización del método explica las ligeras desviaciones entre el estudio colaborativo y el estudio comparativo.

5.4.2.- CONFORMIDAD, CONCORDANCIA Y OPORTUNIDAD RELATIVA DE CONCORDANCIA (COR)

En la tabla 41 figuran los datos de Conformidad, concordancia y oportunidad relativa de concordancia (COR) colaborativo inicial (2013)

Tabla 41: Resultados de conformidad, concordancia y oportunidad relativa de concordancia

	QFast® *Salmonella*			UNE-EN ISO 6579/A1		
Nivel	**Conformidad**	**Concordancia**	**COR**	**Conformidad**	**Concordancia**	**COR**
Nivel 0	82,00%	75,32%	1,50	100,00%	100,00%	1,00
Nivel 1	93,03%	90,13%	1,46	100,00%	100,00%	1,00
Nivel 2	96,63%	96,19%	1,14	100,00%	100,00%	1,00

Conclusiones*:*

En el nivel 0 se detectaron 15 falsos positivos. Tras recavar información sobre la manipulación del método alternativo se establece que la causa de los falsos positivos es contaminación cruzada entre las muestras dopadas con las muestras no dopadas *(*posiblemente en el momento de la lectura cuando el sensor se sujeta con los dedos*)*.

El diseño del sensor podría explicar las desviaciones negativas ya que pueden venir dadas a la hora de la lectura en el momento de inocular la gota en el sensor ya que hay que verificar que ésta alcanza la raya marcada*;* en caso de que la gota no alcance dicha raya no entra por capilaridad.

Nota 2014-2015*: Estas desviaciones fueron comunicadas al fabricante, el cual adopto las acciones necesarias mejorando el diseño del sensor que evitan los problemas de falta de capilaridad. Esta actuación se llevó a cabo una vez finalizado el informe de validación, por lo que no se reflejó en el mismo.*

6. AUDITORÍAS

Introducción

AENOR realiza una auditoría anual en la que verifica el mantenimiento del cumplimiento de Los requisitos establecidos en el "Reglamento de certificación de métodos alternativos validados destinados al control de calidad y seguridad alimentaria (RP B 59)".

Por un lado, se audita el sistema de gestión de calidad en las instalaciones del fabricante con objeto de verificar que se mantienen las condiciones de la concesión establecidas en el Reglamento RP B59.

Po otro lado, se han llevado a cabo ensayos de contraste anual, de manera que a lo largo de los 5 años, el método certificado sea verificado en todas las matrices al menos una vez. Previamente a la auditoría de seguimiento, AENOR prepara una muestra que se divide en dos alícuotas. El auditor facilita al fabricante una de las alícuotas, iniciando el análisis el ensayo de ejecución en presencia del auditor. Una vez finalizado el análisis, se envía el resultado obtenido a AENORlaboratorio. Paralelamente, el laboratorio de AENOR realiza el ensayo en la segunda alícuota. Los resultados serán comparados y da lugar a un informe.

Resultados de la auditoría

Año 2013

- Auditoría: auditoría superada satisfactoriamente.
- Ensayo de ejecución 2013: matriz Heces. Resultado correcto.

Año 2014

- Auditoría: auditoría superada satisfactoriamente.
- Ensayo de ejecución 2014: matriz túrmix con *Salmonella* spp. adicionada. Resultado correcto.

Año 2015

- Auditoría: auditoría superada satisfactoriamente.
- Ensayo de ejecución 2015: matriz yogur con *Salmonella* spp. adicionada. Resultado correcto.

6. APLICABILIDAD

Reactivos y fungibles del kit, condiciones de almacenamiento y vida útil para la presentación lista para usar	• Medio 1 Soft *(*medio líquido de preenriquecimiento*)* en duquesas *(*225 ml*)*. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde fabricación. • Medio 1 Hard *(*medio líquido de preenriquecimiento*)* en duquesas *(*225 ml*)*. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde fabricación. • Suplemento Medio 1 Hard en envase de vidrio con gotero *(*50ml*)*. Conservación entre 4 y 30ºC. Caducidad 15 meses desde fabricación. • Medio 2 *(*medio líquido de enriquecimiento*)* en tubos eppendorf de 1,5 ml. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 15 meses desde fabricación. • Solución inmunocaptura en bote de 3 ml con gotero. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad máxima aprox. 2 años desde fabricación. • Solución de lavado en bote de aproximadamente 50 ml con gotero. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 1 año desde fabricación. • Solución de reacción en bolsa de plástico. Contiene dos goteros con dispensador *(*3 ml*)*, uno con la solución deshidratada y otro con la solución diluyente. Conservación entre -21 y -5ºC. Caducidad 1 año desde fabricación. • Sensor en envase de plástico con silicagel. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 1 año desde fabricación.
Reactivos y fungibles del kit, condiciones de almacenamiento y vida útil para la presentación deshidratada *(*requiere reconstituir los medios de cultivo*)*	• Medio 1 Soft TBR *(*medio deshidratado de preenriquecimiento*)* en envase de plástico *(*500 g*)*. Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad 3 años desde fabricación. • Suplemento Medio 1 Soft en envase de vidrio con gotero *(*50ml*)*. Conservación entre 4 y 30ºC. Caducidad máxima aprox. 1 año desde fabricación. • Medio 1 Hard TBR *(*medio deshidratado de preenriquecimiento*)* en duquesas *(*225 ml*)*. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 3 años desde fabricación.

- Suplemento Medio 1 Hard en envase de vidrio con gotero (50ml). Conservación entre 4 y 30ºC. Caducidad 15 meses desde fabricación.

- Medio 2 TBR (medio deshidratado de enriquecimiento) en bolsa de plástico (2.8 g). Conservación entre 4 y 30 ºC. Caducidad 3 años desde fabricación.

- Solución inmunocaptura en bote de 3 ml con gotero. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad máxima aprox. 2 años desde fabricación.

- Solución de lavado en bote de aproximadamente 50 ml con gotero. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 1 año desde fabricación.

- Solución de reacción en bolsa de plástico. Contiene dos goteros con dispensador (3 ml), uno con la solución deshidratada y otro con la solución diluyente. Conservación entre -21 y -5ºC. Caducidad 1 año desde fabricación.

- Sensor en envase de plástico con silicagel. Conservación entre 2 y 8 ºC. Caducidad 1 año desde fabricación.

Equipos específicos

Específicos para el método QFast®:

Separador magnético iMICROQ
Incubador con agitación iMICROQ
Lector electrónico iMICROQ

Material normal que existe en un laboratorio de microbiología: mecheros Bunsen, estufas, balanzas, vortex, etc.

Para la reconstitución de los medios deshidratados se requiere autoclave y placa calefactora.

Operaciones comunes	Tiempo 1 muestra (min)	Tiempo 24 muestras (min)
Muestreo. Pesada, mezcla	3	75
Operaciones QFast		
Transferencia medio 2	0,5	12
Inmunoseparacion y lavado	4	48
Solucion reacción	0,1	2
Inserción lector + lectura	1,1	24
TOTAL	**5,7**	**86**

7.- CONCLUSIÓN FINAL

Las conclusiones del estudio comparativo son:

El método QFast® presenta una eficacia relativa, especificidad relativa y sensibilidad relativa satisfactoria. En función de los resultados obtenidos se establece que el método QFast® es equivalente al método de referencia.

Los niveles de detección del método alternativo QFast® y del método de referencia son similares.

La exclusividad e inclusividad son totalmente satisfactorios para ambos medios empleados en el método alternativo.

Las conclusiones del estudio colaborativo son:

Los resultados obtenidos en el ejercicio realizado en el año 2014 mejoran los obtenidos en el ejercicio realizado en el 2013.

Los resultados obtenidos en el ejercicio 2014 de eficacia, especificidad y sensibilidad relativa son similares a los obtenidos en el estudio comparativo. La conformidad y concordancia del método alternativo, se sitúan así mismo por encima del 90%.

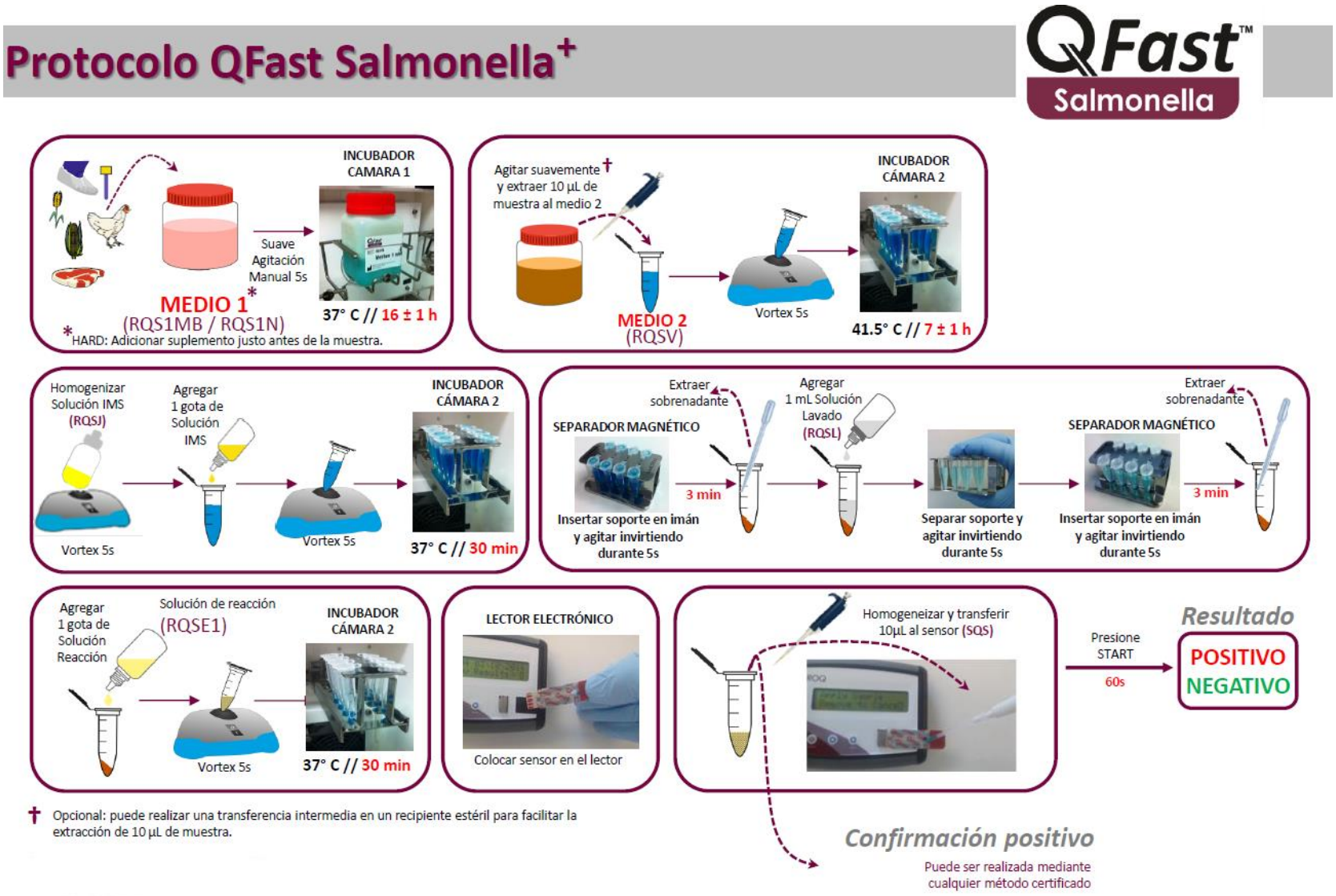
En función de los resultados obtenidos en la presente validación se establece que ambos métodos son equivalentes.

Las conclusiones de las auditorías realizadas han sido:

Tanto los resultados de las auditorías realizadas así como los ensayos de ejecución han sido satisfactorios en los años 2013, 2014 y 2015.

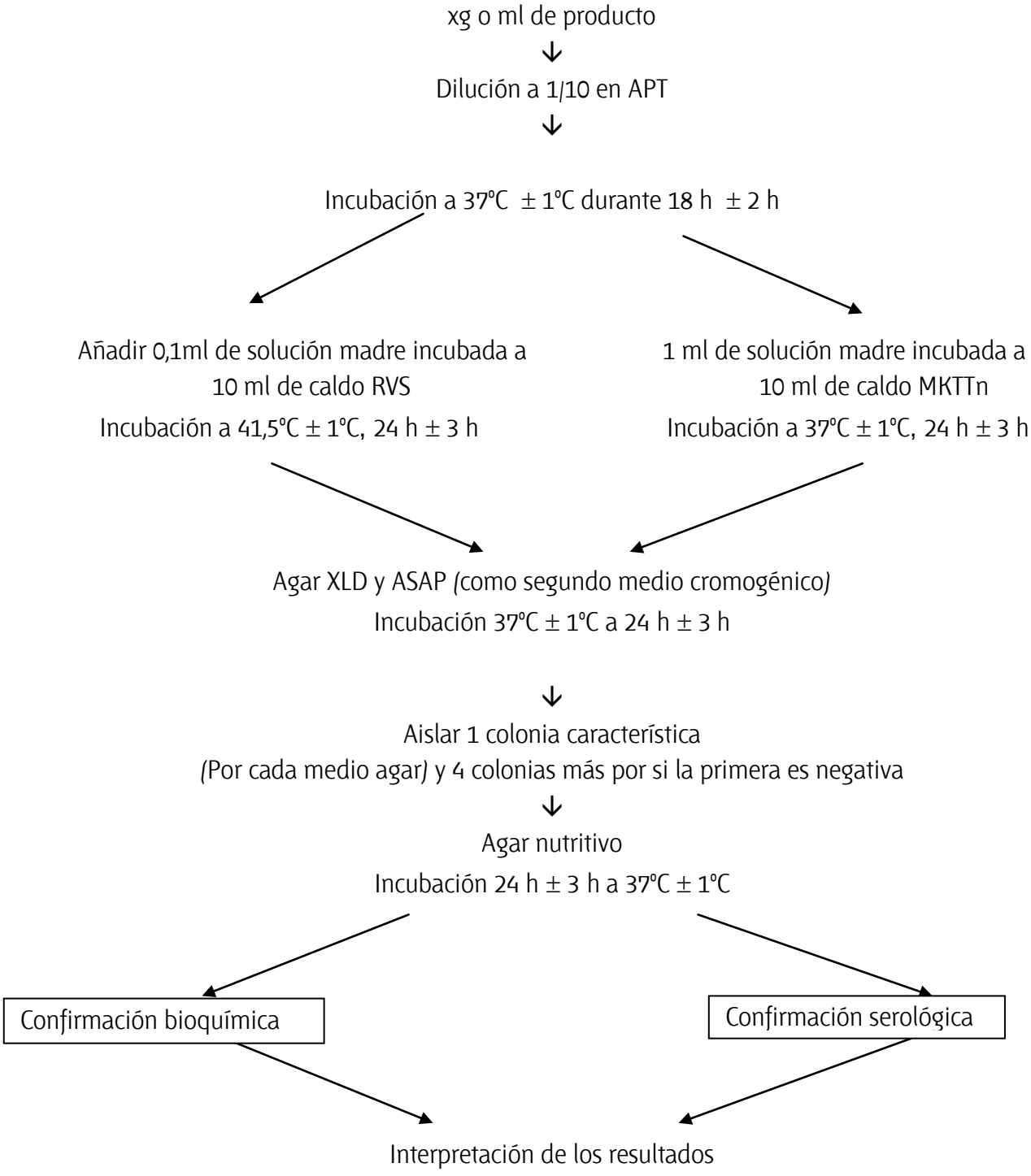
Madrid, 14/07/2016
Agustina Sanchez Díaz
Directora Técnica

Anexo 1–Protocolo del método alternativo QFast®



Anexo 2 – Método de de referencia

UNE-EN ISO 6579:2003 Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.



Anexo 3 - Método de referencia

UNE-EN ISO 6579/A1 - Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria

Pre-enriquecimiento: APT
Dilución 1/10
↓
Incubación a 37ºC ±1ºC durante18 h ± 2 h
↓
Depositar separadamente
3 gotas sobre agar MSRV
*(*0.1 ml en total*)*
↓
Incubación a 41,5ºC ± 1ºC durante 24 h ± 3 h
↓
Lectura de las placas:
Test positivo: zona de migración blanca-grisácea desde la gota inoculada.
Test negativo: re-incubar las placas otras 24 h ± 3 h
↓
Picar con un asa de 1µl en la zona externa de migración
Aislar sobre agar XLD
↓
Incubación a 37ºC ± 1ºC, 24 h ± 3 h
↓
Lectura
Elegir una colonia característica para su aislamiento
↓
Asilar sobre agar nutritivo
Incubar a 37ºC ± 1ºC
24 h ± 3 h
↓
Confirmación bioquímica *(*galerías miniaturizadas*)* y confirmación serológica